

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 1 月    1 日  
Date of Application:

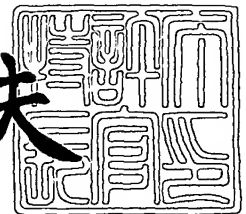
出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 1 9 5 2 1  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 1 9 5 2 1 ]

出      願      人            エーザイ株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年    7 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9956

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成14年11月 1日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ラブコネクチン 3 結合蛋白質

【請求項の数】 12

【発明者】

    【住所又は居所】 京都市下京区西七条石井町 3 3 - 1 7 シャローム 3 3  
                            2 0 2 号

    【氏名】 竹内 勝一

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区学園東町 2 丁目 5 番地の 7 3

    【氏名】 高井 義美

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089244

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100090516

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラブコネクチン 3 結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) または (b) の蛋白質。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質。

【請求項 2】 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の蛋白質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有する請求項 3 記載の DNA。

【請求項 5】 下記 (a) または (b) の DNA。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 6】 下記 (a) または (b) の DNA。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列と相同性が 80 % 以上の塩基配列を有し、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 7】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA により宿主を形質

転換して得られる形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現した、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質を培養物から採取することを含む、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質の製造法。

【請求項 10】 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 11】 請求項 1 もしくは 2 に記載の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【請求項 12】 請求項 1 もしくは 2 に記載の蛋白質またはその異種相同蛋白質である Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラブコネクチン 3 (rabconnectin-3) および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する蛋白質およびそれをコードする DNA に関する。

【0002】

【従来の技術】

Rab3A は、Rab3A, -3B, -3C, -3D の 4 つからなる Rab3 ファミリーのひとつで、神経伝達物質の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エキソサイトーシスの制御に重要な役割を果たすことが知られている。神経伝達物質の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エキソサイトーシスのプロセスは、(1) プレシナプス貯溜プールから、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが存在する原形質膜の活性帯への

シナプス小胞の移動、(2)小胞の活性帯へのドッキング、(3)すでに放出可能な状態にあるプールでの、小胞のドッキングからプライミングへの推移、および、(4)  $\text{Ca}^{2+}$  流入により誘導された小胞と膜の融合のステップを含む。

#### 【0 0 0 3】

Rab3A遺伝子ノックアウトマウス解析により、(1)シナプス小胞のプレシナプス原形質膜への移動とドッキングを促進し、(2)  $\text{Ca}^{2+}$  により誘導された、小胞と原形質膜との融合を阻害するというRab3Aの二つの働きが明らかになっている。しかし、神経伝達物質の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エキソサイトーシスにおける、これらRab3Aの働きの分子メカニズムは知られていない。

#### 【0 0 0 4】

Rab3ファミリーメンバーは、GDP解離抑制蛋白質(Rab GDI)、GDP/GTP交換反応促進蛋白質(Rab3 GEP)およびGTPase活性促進蛋白質(Rab3 GAP)の三つの制御因子により制御されることが知られている。Rab3 GEPとRab3 GAPはRab3ファミリーメンバーに特異であるが、Rab GDIは全てのRabファミリーメンバーに対して活性である。これらの制御因子の働きによるRab3Aの循環的な活性化と不活性化が、神経伝達物質の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エキソサイトーシスにおけるRab3Aの働きに必須である。これら制御因子の働きに関する、現在のモデルの一つは以下の通りである。GDP-Rab3AがRab GDIとの複合体として細胞質中に貯留される。Rab5、-7、-9に対してはGDI置換因子(GDF)、またはYpt1と-7に対してはRabリサイクリング因子(RRF)の様に、他の未同定分子の助けを受け、Rab3 GEPの働きによりGDP-Rab3AがGTP-Rab3Aに活性化される部位であるシナプス小胞に、この複合体が動員される。GDFとRRFは同定されていない。GTP-Rab3Aは、その下流の二つのエフェクター、すなわち、小胞と活性帯にそれぞれ存在するラブフィリン3(rabphilin-3)とRim-3に結合する。融合段階の前または後に、エフェクターと複合体を形成するGTP-Rab3Aは、Rab3 GAPの働きによりGDP-Rab3Aに非活性化される。GDP-Rab3AはRab GDIによりトラップされ、小胞から細胞質に移動する。それゆえ、Rab3 GEPとRab3 GAPはおそらくそれらが機能するとき、小胞へ動員されると考えられるが、それらのメカニズムは依然不明である。

#### 【0 0 0 5】

最近、ラット脳の粗シナプス小胞(CSV)画分から、Rab3 GEPまたはRab3 GAPを用いた共免疫沈降により新規蛋白質が単離され、ラブコネクチン3と命名されている(非特許文献1参照)。ヒトラブコネクチン3は3,036アミノ酸からなり、計算上の分子量は339,753である。ラブコネクチン3は12個のWDドメインを持つ。ラブコネクチン3は、シナプス小胞と関連する脳に豊富に発現している。また、さらにふたつの蛋白質がラット脳のCSV画分からRab3 GEPを用いて共免疫沈降されることが見出されている(非特許文献1参照)。

**【0006】****【非特許文献1】**

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、第12号、第9629-9632頁

**【0007】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、Ca<sup>2+</sup>依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質を提供すること、ならびに、この蛋白質を用いる、Ca<sup>2+</sup>依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法を提供することである。

**【0008】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、GDP/GTP交換反応促進蛋白質に直接結合するラブコネクチン3結合蛋白質を得ることに成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

**【0009】**

(1) 下記(a)または(b)の蛋白質。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質。

**【0010】**

(2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する (1) 記載の蛋白質。

【0011】

(3) (1) または (2) の蛋白質をコードする DNA。

【0012】

(4) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4470 の塩基配列を有する (3) の DNA。

【0013】

(5) 下記 (a) または (b) の DNA。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4470 の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4470 の塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【0014】

(6) 下記 (a) または (b) の DNA。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4470 の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4470 の塩基配列と相同性が 80% 以上の塩基配列を有し、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【0015】

(7) (3) ~ (6) のいずれか 1 項の DNA を含む組換えベクター。

【0016】

(8) (3) ~ (6) のいずれか 1 項の DNA により宿主を形質転換して得られる形質転換体。

【0017】

(9) (8) の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現した、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質を培養物

から採取することを含む、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質の製造法。

【0018】

(10) (1) または (2) の蛋白質に対する抗体。

【0019】

(11) (1) もしくは (2) の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【0020】

(12) (1) もしくは (2) の蛋白質またはその異種相同蛋白質である Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【0021】

【発明の実施の形態】

<1>本発明の蛋白質等

本発明の蛋白質は、ラブコネクチン 3 および Rab3 GEP に直接結合する蛋白質である。本発明の蛋白質はラブコネクチン 3 と複合体を形成することから、以下、本発明蛋白質をラブコネクチン 3  $\beta$  と、ラブコネクチン 3 をラブコネクチン 3  $\alpha$  とも呼ぶ。

【0022】

本発明の蛋白質のうち、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質は、後述の実施例に記載したように、ヒトのラブコネクチン 3  $\beta$  として特定された蛋白質である。蛋白質には、同一の機能を有する変異体の存在が予測され、また、蛋

白質のアミノ酸配列を、例えば保存的置換のように適宜改変することによって、同一の機能を有する変異体を得ることができる。従って、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質も本発明の蛋白質に包含される。

#### 【0023】

蛋白質のアミノ酸配列の改変は、部位特異的変異誘発法などの周知の手段により蛋白質をコードする DNA の塩基配列を改変し、塩基配列が改変された DNA を発現させることによって行うことができる。また、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性は、生理的な条件でこれらに結合することを意味し、この活性は公知の蛋白質相互間の結合を測定する方法に従って測定できる（例えば、後記実施例、または、「タンパク実験プロトコール 機能解析編」、秀潤社(1997)、第 9 章 免疫沈降、親和性レジンを用いた相互作用解析、第 151～161 頁参照）。従って、同一の機能を有するか否かを決定することは当業者であれば容易である。

#### 【0024】

本発明の蛋白質は、好ましくは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する。

#### 【0025】

本発明の蛋白質は、グルタチオントランスフェラーゼ (GST) や His タグなどの他の蛋白質と融合させることにより融合蛋白質とされていてもよい。

#### 【0026】

本発明の DNA は、本発明の蛋白質をコードする DNA である。本発明の DNA としては、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1～4470 の塩基配列を有する DNA が挙げられる。この DNA は、後述の実施例において、塩基配列が決定された DNA である。遺伝子には、同一の産物をコードするが塩基配列の異なる遺伝子や同一の機能を有する変異体をコードする対立遺伝子の存在が予測され、また、塩基配列の改変により、同一の産物や同一の機能を有する変異体をコードする遺伝子を得ることができる。従って、本発明の DNA には、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1～4470 の塩基配列に類似する塩基配列を有し、か

つ、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA も包含される。類似の塩基配列を有する DNA としては、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ～ 4470 の塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA、または、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ～ 4470 の塩基配列と相同性が 80% 以上の塩基配列を有する DNA が挙げられる。

**【0027】**

ストリンジェントな条件としては、0.1% SDS を含む 4×SSC 中 42℃ でのハイブリダイゼーション、次いで 0.1% SDS を含む 2×SSC 中 25℃ での 1 時間の洗浄が挙げられる。洗浄は、好ましくは、0.1% SDS を含む 0.1×SSC 中 50℃ での 1 時間の洗浄である。

**【0028】**

相同性は、BLAST により算出される値である。

**【0029】**

配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ～ 4470 の塩基配列に類似する塩基配列を有する DNA は、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ～ 4470 の塩基配列を有する DNA またはその DNA を保持する宿主を突然変異誘発処理し、得られた変異体から、上述のストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA、または、上述の相同性を有する DNA を選択することにより得ることができる。上述のようにラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性は公知の方法に従って測定でき、従って、このような DNA から、ラブコネクチン 3 および GDP/GTP 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA を選択することは当業者にとって容易である。

**【0030】**

本発明の DNA は、明らかにされた塩基配列に基づき常法により得ることができる。例えば、化学合成法により合成してもよいし、適宜設定されたプライマーを用いて、本発明の蛋白質を発現している細胞や組織から調製された mRNA から逆転写-PCR 法により得てもよい。

**【0031】**

本発明のベクターは、本発明のDNAを含む組換えベクターである。本発明のベクターは、常法により本発明のDNAをベクターに挿入することにより得ることができる。本発明のDNAが挿入されるベクターとしては特に制限はなく、例えば、クローニング用ベクターとして通常に使用されるもの、哺乳動物細胞発現用ベクターとして通常に使用されるものが挙げられる。本発明の蛋白質を生産する目的でベクターを使用する場合には、特に発現ベクターが有用である。

#### 【0032】

本発明の形質転換体は、本発明のDNAにより宿主を形質転換して得られる形質転換体であり、本発明の蛋白質を発現する。

#### 【0033】

宿主としては、特に制限はなく、動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞などが挙げられる。形質転換は、常法により行えばよく、本発明のベクターを導入することによって行うことが好ましい。

#### 【0034】

本発明の製造法は、本発明の蛋白質すなわちラブコネクチン3結合蛋白質の製造法であり、本発明の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現したラブコネクチン3結合蛋白質を培養物から採取することを含む。

#### 【0035】

培養は、形質転換体が発明の蛋白質を発現する条件で行えばよく、培養物からの本発明の蛋白質の採取は、蛋白質の精製に通常に用いられる、種々のクロマトグラフィー、電気泳動、ゲル濾過などの方法を適宜組み合わせて行えばよい。本発明の蛋白質を、GSTやHisタグとの融合蛋白質として発現させる場合には、それぞれグルタチオンセファロースカラムやニッケルセファロースカラムを用いて精製することが可能である。

#### 【0036】

ラブコネクチン3 $\beta$ とラブコネクチン3 $\alpha$ は、抗ラブコネクチン3 $\alpha$ 抗体および抗ラブコネクチン3 $\beta$ 抗体のいずれを用いても共免疫沈降される。両タンパクは、0.5 M NaClまたは1% CHAPS存在下では互いから分離しないが、1 M NaCl存在下で一部が、1%デオキシコレート存在下では完全に分離する。さらに、これらの

二つのタンパクは、シナプス小胞に共存する。これらの結果は、ラブコネクチン  $3\alpha$  と  $3\beta$  とがサブユニット構造を構成することを示している。

#### 【0037】

ラブコネクチン  $3\alpha$  は膜貫通部分を持たないが、シナプス小胞と結合することが示されている（上記非特許文献1）。ラブコネクチン  $3\alpha$  は、Triton X-100やNP-40の様な界面活性剤の存在下で小胞から分離することから、この蛋白質はシナプス小胞の表在性膜蛋白質の一つであることが示唆される。同様に、ラブコネクチン  $3\beta$  は膜貫通部分を持たず、同じ状況下で小胞から分離することから、この蛋白質もまた、シナプス小胞の表在性膜蛋白質の一つであることが示唆される。

#### 【0038】

ラブコネクチン  $3\beta$  は直接Rab3 GEPに化学量論的に結合するが、ラブコネクチン  $3\alpha$  は結合しない。ラブコネクチン  $3\alpha$  と  $3\beta$  の複合体は直接Rab3 GEPに結合するが、化学量論的にはこの結合はラブコネクチン  $3\beta$  のものよりもずっと小さいことから、 $3\alpha$  と  $3\beta$  との相互作用が、Rab3 GEPが複合体に結合しない様にその結合部位を隠すことが示唆される。対照的に、ラブコネクチン  $3\alpha$ 、 $3\beta$ 、およびそれらの複合体のいずれもRab3 GAPに結合しないことから、ラブコネクチン  $3\beta$  は間接的に、おそらくは未同定の分子を介して、Rab3 GAPに結合すると示唆される。

#### 【0039】

なお、ラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質は、J. Biol. Chem., 272, 3875-3878(1997)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785、特開平10-210971号公報等に記載されているようにして得ることができる。

#### 【0040】

##### <2>本発明のスクリーニング法

本発明の蛋白質は、ラブコネクチン3およびRab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合する。従って、本発明の蛋白質は、これらの結合を増加または減少させる物質のスクリーニングに用いることができる。本発明の蛋白質はヒト由来のものであるが、この用途には、ラットなどの他種に存在する同活性を有する異種相同

蛋白質も本発明の蛋白質と同様に使用できる。従って、本発明の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法、ならびに、本発明の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるRab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、Rab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、Rab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質結合蛋白質とRab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法が提供される。

#### 【0041】

ラブコネクチン3結合蛋白質とラブコネクチン3との結合、および、Rab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質結合蛋白質とRab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質との結合の測定は、蛋白質相互間の結合を測定する公知の方法に従って行うことができる。

#### 【0042】

本発明の蛋白質およびその異種相同蛋白質は、p160は神経伝達物質放出等のシナプス小胞の輸送の制御に関与していると考えられるので、このように選択されたこれらの結合を促進または阻害する物質は、シナプス小胞の輸送の異常が原因となる疾患（例えば、知的障害（精神遅滞）、注意欠陥多動障害、自閉性障害、学習障害）の治療剤の有効成分として使用できると考えられる。

#### 【0043】

このような治療剤（医薬）は、スクリーニングにより選択された物質（有効成分）を、製剤化することにより製造できる。製剤化は、選択された物質の種類、製剤の形態等により適宜、通常の方法に従って行うことができる。医薬は、有効成分と医薬的に許容な可能な担体との医薬組成物としてもよい。

#### 【0044】

**【実施例】**

本発明を下記実施例により更に詳しく説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

**【0045】****【実施例1】****(1) Rab3 GEPと共免疫沈降されたラット蛋白質の取得**

J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)に記載された方法に従って、ラット脳のCSV画分抽出物に対して抗Rab3 GEP抗体を用いて共免疫沈降を行い、沈降物に対して電気泳動を行った。具体的には以下のように行った。この文献に記載のようにラット脳からCSV画分を調製した。画分を、バッファーA (20 mM Tris/HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.8% n-オクチルグルコピラノシド) を用いて抽出し、抽出物 (各2 mgのタンパク) を、抗Rab3 GEP抗体を固定したプロテインAセファロースビーズ (20  $\mu$  l湿重量) と共に4℃で一晩静置した。バッファーAでビーズを完全に洗浄した後、結合した蛋白質を、ビーズをSDSサンプルバッファー (60 mM Tris/HCl (pH 6.7), 3% SDS, 2% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 5% グリセロール) 中で煮沸して抽出した。抽出物をSDS-PAGEにかけ、蛋白質染色を行った。この結果、ラブコネクチン3 (バンドNo.1)、p160 (バンドNo.3)そしてp60 (バンドNo.4)の他に、Rab3 GEPと共免疫沈降されたふたつのタンパク (バンドNo.2)が検出された (図1のA)。

**【0046】**

No.3バンドをゲルから切り出してトリプシンで消化し、そしてそのペプチドを質量分析にかけた。コンピューターデータベース検索により、p160がヒトcDNA断片 (KIAA0541, GenBankアクセッション番号AB011113) から推定されるアミノ酸配列を含むことが明らかになった。

**【0047】**

なお、下記(5)に示すように、p160はラブコネクチン3と複合体を形成することが判明したので、以下、p160をラブコネクチン3  $\beta$ 、ラブコネクチン3をラブコネクチン3  $\alpha$  と呼ぶ。

**【0048】**

## (2) 分子クローニングと一次構造決定

KIAA0541 cDNAは、約3.5kbのコーディング領域とインフレーム停止コドンを含むが、予想される開始コドンを欠いていた。また、KIAA0541 cDNAの配列はヒトゲノムのBACクローンに含まれていた (GenBankアクセッション番号AC007052およびAC008006)。この情報を基礎として、ヒトラブコネクチン3 $\beta$  cDNAの5'末端を得るためにPCRを行った。具体的には以下のように行った。ATG GCA GGA AAC A GC CTT GTT CTA CCC ATT GTT C (配列番号3) /GTT GTC ATT GCC AGC CCT TCT T CA CTT CCC (配列番号4) の配列を有するプライマーセットを設計した。cDNA断片を、ヒト心臓cDNA (CLONTECH) からこれらのプライマーを用いて増幅した。PCR産物はpCR4 Bluntベクター (Invitrogen) にサブクローンした。DNAシーケンシングを、ジデオキシ核酸ターミネーション法により、DNAシーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, PE Biosystems) で行った。この結果、約1.0kbのコーディング領域と予想される開始コドンを含むcDNA断片を得た。

### 【0049】

ヒトラブコネクチン3 $\beta$  cDNAの全長が、このcDNA断片をKIAA0541 cDNAにライゲーションすることで得られた (配列番号1)。コードされる蛋白質は1,490アミノ酸からなり、計算上の分子量は163,808であった (配列番号2)。ヒトラブコネクチン3 $\beta$ は7つのWDドメインを含んでいた (図1のB)。ライゲートしたcDNAがヒトラブコネクチン3 $\beta$ の全長をコードするかどうかを確認するため、このcDNAをHEK293細胞にトランスフェクトし、細胞抽出物をSDS-PAGEにかけ、続いて抗ラブコネクチン3 $\beta$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。具体的には以下のように行った。pCMVFaラブコネクチン3 $\beta$  (下記(3)参照)をHEK293細胞にトランスフェクトし、その細胞の溶解液をSDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル) にかけ、続いて抗ラブコネクチン3 $\beta$ -1抗体 (下記(3)参照)を用いたウエスタンブロッティングが行われた。対照としてHEK293細胞溶解液とラット脳ホモジェネートを、同様にSDS-PAGEにかけ、続いてウエスタンブロッティングを行った。この結果、分子量約160kDaのタンパクが検出された (図1のC)。図1のC中、各レーンは以下の通りである。レーン1, 対照HEK293細胞(1 $\mu$ g蛋白質)、レーン2, pCMVFaラブコネクチン3 $\beta$ をトランスフェクトしたHEK293

細胞(1 $\mu$ g蛋白質)、- レーン 3, ラット脳ホモジェネート(20 $\mu$ g蛋白質)。

#### 【0050】

この分子量は、ラット脳由来の天然のラブコネクチン 3  $\beta$  と同様であった。それゆえ、このcDNAがヒトラブコネクチン 3  $\beta$  の全長をコードすると結論された。ヒトラブコネクチン 3  $\beta$  は、ラットTRAG(GenBankアクセッション番号AF305813)とヒトWDR7(GenBankアクセッション番号XM028588)に似た領域構造を示した。TRAG はこれまで、TGF- $\beta$  耐性細胞株で発現する蛋白質として同定されていたが、その機能は知られていない (Cytogenet. Cell Genet. 88, 324-325, 2000)。

#### 【0051】

##### (3) ラブコネクチン 3 $\beta$ に対する抗体の調製

ラブコネクチン 3  $\beta$  の発現ベクターを、pGex4T-1 (Amersham Biosciences Inc) を用いて構築した。構築物はラブコネクチン 3  $\beta$  の以下のアミノ酸配列を含んでいた。pGex4T-1ラブコネクチン 3  $\beta$ -1、アミノ酸番号487-625; pGex4T-1ラブコネクチン 3  $\beta$ -2、アミノ酸番号615-920。

#### 【0052】

GST融合タンパクはE. coliで発現させ、グルタチオンセファロースビーズ (Amersham Biosciences Inc.) を用いて精製した。抗原としてGST-ラブコネクチン 3  $\beta$ -1および-2をそれぞれ用いてウサギポリクローナル抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -1および-2抗体を作成し、NHS-活性化セファロースビーズ (Amersham Biosciences Inc.) に各抗原を共有結合したものをを用いてアフィニティー精製した。

#### 【0053】

##### (4) ラブコネクチン 3 $\beta$ の組織および細胞下(subcellular)の分布の検討

ラブコネクチン 3  $\beta$  の組織および細胞下分布を検討した。組織分布については、種々のラット組織のホモジェネート(各20 $\mu$ g蛋白質)をSDS-PAGEにかけ、続いて抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。細胞下分布については、ラット大脳のホモジェネートを、細胞下分画し (J. Biol. Chem., 265, 11872-11879 (1990))、各画分(各10 $\mu$ g蛋白質)をそれぞれSDS-PAGEにかけ、抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -1抗体、抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体、または抗Rab3 GEP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

## 【0054】

この結果、組織分布解析により、ラブコネクチン 3  $\beta$  が脳に特異的に発現していることが明らかになった (図 2 の A)。脳での細胞レベル下分布解析により、ラブコネクチン 3  $\beta$  が CSV 画分中に高濃度であることを示した (図 2 の B)。図 2 の B における記号は以下の画分等を示す。Rc-3  $\beta$ , ラブコネクチン 3  $\beta$ 、Rc-3  $\alpha$ , ラブコネクチン 3  $\alpha$ 、GEP, Rab3 GEP、Ho, ホモジェネート画分、P1, 核ベレット画分、P2, 粗シナプトソーム画分、P3, ミクロソーム画分、S, 可溶性細胞質画分、P2A, ミエリン画分、P2B, 小胞体およびゴルジ複合体画分、P2C, シナプトソーム画分、P2D, ミトコンドリア画分、SS, シナプス可溶性画分、CSV, 粗シナプス小胞画分、CSM, 粗シナプス膜画分。なお、図に示した結果は 3 つの独立した実験の典型的なものである。

## 【0055】

さらに、マウス海馬とラット海馬ニューロンの初代培養 (J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)) について免疫電子顕微鏡観察 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 202, 1235-1243 (1994)) を行った。

## 【0056】

試料は、抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体と抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体を用いて二重染色を行い、続いて免疫蛍光顕微鏡法で観察した。

## 【0057】

この結果、ラブコネクチン 3  $\beta$  はラブコネクチン 3  $\alpha$  と共に、マウス海馬のシナプス領域と初代培養を行ったラット海馬ニューロンに共存していることが明らかになった (図 3 の Aa と Ab)。図 3 の Aa は、マウス海馬 CA3 領域、Ab は、ラット海馬ニューロン初代培養 (培養 20 日目) である。記号は以下の通りである。SR, 放線状層、SL, 淡明層、SP, 錐体層、バー, 30  $\mu\text{m}$ 。

## 【0058】

また、培養 22 日目のニューロンを、抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -1 抗体で染色した (図 3 の B)。図 3 の B においてバーは 200 nm を示す。この結果は、ラブコネクチン 3  $\beta$  がシナプス小胞と関連することを示した (図 3 の B)。

## 【0059】

これらの結果は、ラブコネクチン 3  $\beta$  とラブコネクチン 3  $\alpha$  がシナプス小胞に共存することを示す。なお、図 3 に示した結果は、3 つの独立した実験の典型例である。

#### 【0060】

(5) ラブコネクチン 3  $\beta$  に対する、ラブコネクチン 3  $\alpha$ 、Rab3 GEP および Rab3 GAP の結合の検討

ラブコネクチン 3  $\beta$  とラブコネクチン 3  $\alpha$  の結合を検討した。CSV 画分の抽出物を、抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  または 3  $\beta$ -2 抗体による免疫沈降にかけた。各免疫沈降物を SDS-PAGE (8% ポリアクリルアミドゲル) にかけて、続いて抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  または 3  $\beta$ -1 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。さらに、抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体を用いた免疫沈降物は、まず 0.5 M NaCl または 1% CHAPS で洗浄し、次いで SDS-PAGE (8% ポリアクリルアミドゲル) にかけて、さらにクーマシーブリリアントブルーによるタンパク染色を行った。結果を図 4 の Aa~Ac に示す。Aa は、抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体による免疫沈降物、Ab は、抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体による免疫沈降物、Ac は、NaCl または CHAPS 処理を行った、抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体による免疫沈降物の結果である。

#### 【0061】

ラブコネクチン 3  $\alpha$  がその抗体を用いて P2C 画分抽出物から免疫沈降されたとき、ラブコネクチン 3  $\beta$  はウエスタンブロッティングから予想されたように共免疫沈降された (図 4 の Aa)。逆に、ラブコネクチン 3  $\beta$  がその抗体を用いて P2C 画分抽出物から免疫沈降されたとき、ラブコネクチン 3  $\alpha$  が共免疫沈降された (図 4 の Ab)。抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体により共免疫沈降されたラブコネクチン 3  $\alpha$  およびラブコネクチン 3  $\beta$  を、0.5 M NaCl または 1% CHAPS のどちらかで洗浄し、続いてクーマシーブリリアントブルーでタンパク染色した。両タンパクは互いに分離せず、明らかに同じ分子比率で染色された (図 4 の Ac)。ラブコネクチン 3  $\alpha$  とラブコネクチン 3  $\beta$  は、1 M NaCl で一部が、1% デオキシコレートで完全に互いに分離した (データ省略)。これらの結果は、ラブコネクチン 3  $\alpha$  とラブコネクチン 3  $\beta$  が複合体を形成することを示している。

#### 【0062】

次に、ラブコネクチン 3  $\alpha$  および 3  $\beta$  のいずれが Rab3 GEP および Rab3 GAP に結合しているかを調べた。この目的のため、昆虫細胞から得たラブコネクチン 3  $\beta$  と Rab3 GEP、そして E.coli. から得た Rab3 GAP の非触媒サブユニット (p150) の純粋なサンプルを調製した (J. Biol. Chem., 272, 3875-3878 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785 参照)。ラブコネクチン 3  $\alpha$  は巨大な蛋白質なので、その全長蛋白質を、COS7 細胞のような哺乳類細胞株で発現させることや、その純粋なリコンビナントサンプルを E.coli や昆虫細胞から用意することにまだ成功していない。それゆえ、天然のラブコネクチン 3  $\alpha$ 、および、3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体をラット脳 P2C 画分から調製した。ラブコネクチン 3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体は、プロテイン A セファロースビーズに結合した抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体を用いて、P2C 画分から免疫沈降され、続いて 0.5 M NaCl でビーズが洗浄された。このサンプルはラブコネクチン 3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体として使われた。鎖の調製をするための別の実験で、プロテイン A セファロースビーズに結合した抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体を用いて P2C 画分から免疫沈降されたラブコネクチン 3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体は、3  $\alpha$  を 3  $\beta$  から分離するために、1 M NaCl で洗浄された。ビーズより分離された 3  $\alpha$  は、続いてプロテイン A セファロースビーズに固定した 3  $\alpha$  に対する抗体を用いて免疫沈降された。

#### 【0063】

ラブコネクチン 3  $\beta$ 、3  $\alpha$  または複合体と結合されたアフィニティービーズを準備した。ラブコネクチン 3  $\beta$  結合ビーズに関しては、製造者のプロトコールに基づき (GIBCO BRL) pFastBac Hta ラブコネクチン 3  $\beta$  を用いて、ラブコネクチン 3  $\beta$  cDNA を持つバキュロウイルスを準備し、バキュロウイルスを High Five cell (Invitrogen) にトランスフェクトした。細胞の抽出物 (5mg 蛋白質) をバッファー A を用いて調製し、プロテイン A セファロースビーズ (20  $\mu$ l 湿容量) に固定された抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体と共に 4  $^{\circ}$ C で一晩静置した。ラブコネクチン 3  $\alpha$  結合ビーズに関しては、初めに、プロテイン A セファロースビーズに結合された抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体を用いて、ラブコネクチン 3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体を上記の P2C 画分から免疫沈降させた。次いでラブコネクチン 3  $\alpha$  を 1 M NaCl を含むバッファー A により 4  $^{\circ}$ C で 1 時間洗浄することでビーズから分離した。分離

したラブコネクチン 3  $\alpha$  (0.4  $\mu$ g 蛋白質) を回収し、プロテインAセファロースビーズ (20  $\mu$ l 湿容量) に固定された抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体と共に 4  $^{\circ}$ C で一晚静置した。複合体結合ビーズに関しては、ラブコネクチン 3  $\alpha$  と 3  $\beta$  の複合体を P2C 画分から同様に免疫沈降させ、次いで 0.5 M NaCl を含むバッファA でビーズを洗浄した。ラブコネクチン 3  $\alpha$ 、3  $\beta$ 、または複合体と結合したアフィニティービーズは、次いで、バッファA で完全に洗浄した。

#### 【0 0 6 4】

リコンビナント Rab3 GEP または GAP p150 を、リコンビナントラブコネクチン 3  $\beta$  または天然のラブコネクチン 3  $\alpha$  と結合したプロテインAセファロースビーズと静置した。また一方、ビーズ上に固定された抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -2 抗体により、P2C 画分からラブコネクチン 3  $\alpha$  および 3  $\beta$  が免疫沈降された後、ビーズを 0.5 M NaCl で洗浄し、Rab3 GEP または GAP p150 をビーズと共に静置した。静置の後、これらを SDS-PAGE (8% ポリアクリルアミドゲル) にかけて、続いてクーマシーブリリアントブルーによるタンパク染色または抗 Rab3 GEP もしくは GAP p150 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。結果を図 4 の Ba1 ~ Bb2 に示す。Ba は、ラブコネクチン 3  $\alpha$  が結合したビーズ、Bb は、ラブコネクチン 3  $\beta$  が結合したビーズを示し、数字は、1 が Rab3 GEP、2 が Rab3 GAP p150 を示す。

#### 【0 0 6 5】

この結果、ラブコネクチン 3  $\beta$  はリコンビナント Rab3 GEP に化学量論的に結合したが、ラブコネクチン 3  $\alpha$  は結合しなかった (図 4 の Ba1 および Bb1)。複合体は Rab3 GEP に直接結合したが、化学量論的にはこの結合は、ラブコネクチン 3  $\beta$  のものに比べ相当低かった (データ省略)。一方、ラブコネクチン 3  $\alpha$ 、3  $\beta$  そして複体のいずれも、Rab3 GAP には結合しなかった (図 4 の Ba2, Bb2 (複合体についてはデータ省略))。

#### 【0 0 6 6】

CSV 画分の抽出物を、抗 Rab3 GEP または GAP p150 抗体による免疫沈降にかけた。各免疫沈降物を SDS-PAGE (8% ポリアクリルアミドゲル) にかけて、続いて抗 Rab3 GEP または GAP p150 抗体そして抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体および抗ラブコネクチン 3  $\beta$ -1 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。結果を図 4 の Ca およ

びCbに示す。Caは、抗Rab3 GEP抗体を用いた免疫沈降物、Cbは、抗Rab3 GAP p150抗体を用いた免疫沈降部の結果である。

#### 【0067】

ラブコネクチン 3  $\beta$  は、ラブコネクチン 3  $\alpha$  と同様に、P2C画分の抽出物から、抗Rab3 GEPまたは抗Rab3 GAP p150抗体を用いてそれぞれ、Rab3 GEPまたはRab3 GAP p150により一貫して共免疫沈降された（図4のCaおよびCbならびに図1のA参照）。

#### 【0068】

総合すると、これらの結果は、制御された様式で、ラブコネクチン 3  $\beta$  が、直接的にRab3 GEPに結合し、また、未同定の分子を介して間接的にRab3 GAPに結合することを示す。なお、図4の結果は、3つの独立した実験の典型例である。

#### 【0069】

なお、実施例1で用いられた抗Rab3 GAP p150抗体、抗Rab3 GEP抗体および抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体は、J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785 (1998)およびJ. Biol. Chem., 273, 34580-34585 (1998)に記載された方法により調製されたマウスモノクローナル抗Rab3 GAP p150抗体、ウサギポリクローナル抗Rab3 GEP抗体、および、ラットポリクローナル抗ラブコネクチン 3  $\alpha$  抗体である。J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)には、抗Rab3 GEP抗体またはRab3 GAP p150抗体を用い、ラブコネクチン 3  $\alpha$  がRab3 GEPまたはGAPによりCSV画分からそれぞれ共免疫沈降されることが示されている。

#### 【0070】

##### 【実施例2】

ポリL-リジンをコートしたウェルで  $1 \times 10^6$  の神経芽腫細胞PC-12を培養し、培養開始日の翌日にリポフェクション法によりmycを発現するpCMV myc及びP160（ラブコネクチン 3  $\beta$ ）をmycとの融合タンパク質として発現するpCMV myc:p160をトランスフェクトした。pCMV mycは、J. Biol. Chem, 272, 11943-11951(1997)に記載されている。pCMV myc:p160は、ラブコネクチン 3  $\beta$  のアミノ酸配列1～1490（全長）をコードするDNAを、ラブコネクチン 3  $\beta$  とmycとの融合蛋白質が発

現されるように組み込んだものである。

#### 【0071】

トランスフェクションの2日後に、低カリウム（カリウム濃度：4.7 mM）バッファーを加え、37℃で10分間インキュベートした後、バッファーを取り除いて、低カリウム濃度または高カリウム（カリウム濃度：60 mM）のバッファーを加えた。37℃で10分間インキュベートした後、上清中に分泌された成長ホルモン（GH）及び細胞に残されたGHの量を、hGH ELISAキット（ロッシュ社製）にて測定した。結果は、上清中及び細胞中のGHをあわせた量を100%として、分泌されたGHの割合（%）として表現した。

#### 【0072】

その結果、低カリウムバッファーでは全体の2.3%しか放出されなかった成長ホルモンが、高カリウムバッファーでは、8.9%が放出され、カリウムの刺激により増加した成長ホルモンの放出は、p160を発現させることにより7.0%まで抑制された。この結果より、p160は成長ホルモン放出等のシナプス小胞の輸送の制御に関与していると考えられる。

#### 【0073】

##### 【発明の効果】

本発明により、Ca<sup>2+</sup>依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質、ならびに、この蛋白質を用いる、Ca<sup>2+</sup>依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法が提供される。

#### 【0074】

##### 【配列表】

<110> エーザイ株式会社 (Eisai Co., Ltd.)

<120> ラブコネクチン3結合蛋白質

<130> P-9956

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4473

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(4470)

&lt;400&gt; 1

atg gca gga aac agc ctt gtt cta ccc att gtt ctt tgg ggt cga aaa 48

Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Leu Pro Ile Val Leu Trp Gly Arg Lys

1 5 10 15

gcg ccc aca cat tgc atc tca gcg gta ctt tta aca gat gat ggg gcc 96

Ala Pro Thr His Cys Ile Ser Ala Val Leu Leu Thr Asp Asp Gly Ala

20 25 30

acg atc gta aca gga tgt cac gac gga caa ata tgt ctc tgg gat ctt 144

Thr Ile Val Thr Gly Cys His Asp Gly Gln Ile Cys Leu Trp Asp Leu

35 40 45

tca gta gaa ctg caa att aat cct cga gca ctg ttg ttt ggt cat aca 192

Ser Val Glu Leu Gln Ile Asn Pro Arg Ala Leu Leu Phe Gly His Thr

50 55 60

gca tca atc act tgt ttg tct aaa gct tgt gct tcc agt gac aaa cag 240

Ala Ser Ile Thr Cys Leu Ser Lys Ala Cys Ala Ser Ser Asp Lys Gln

65 70 75 80

tat att gtg agt gca tct gaa agt gga gag atg tgc ctc tgg gat gtg 288

Tyr Ile Val Ser Ala Ser Glu Ser Gly Glu Met Cys Leu Trp Asp Val

85	90	95	
agt gat ggc aga tgt att gaa ttt aca aaa tta gct tgc aca cat act			336
Ser Asp Gly Arg Cys Ile Glu Phe Thr Lys Leu Ala Cys Thr His Thr			
100	105	110	
ggc ata cag ttc tac cag ttc tct gtt ggg aat cag cga gaa gga agg			384
Gly Ile Gln Phe Tyr Gln Phe Ser Val Gly Asn Gln Arg Glu Gly Arg			
115	120	125	
ctt tta tgc cac gga cat tac cct gaa atc ctt gtt gtg gat gct acc			432
Leu Leu Cys His Gly His Tyr Pro Glu Ile Leu Val Val Asp Ala Thr			
130	135	140	
agc ctt gaa gta tta tac tcc tta gta tca aag ata tca cca gac tgg			480
Ser Leu Glu Val Leu Tyr Ser Leu Val Ser Lys Ile Ser Pro Asp Trp			
145	150	155	160
att agc tcc atg agt att att cga tcc cac cga aca caa gag gac aca			528
Ile Ser Ser Met Ser Ile Ile Arg Ser His Arg Thr Gln Glu Asp Thr			
165	170	175	
gtg gta gca ctc tcg gtg act ggc atc ctg aag gtc tgg att gtt acc			576
Val Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Ile Leu Lys Val Trp Ile Val Thr			
180	185	190	
tcg gaa ata agt gac atg cag gat act gag cca ata ttt gag gag gaa			624
Ser Glu Ile Ser Asp Met Gln Asp Thr Glu Pro Ile Phe Glu Glu Glu			
195	200	205	
tcc aaa cca att tat tgt cag aat tgc caa agc atc tct ttt tgt gca			672
Ser Lys Pro Ile Tyr Cys Gln Asn Cys Gln Ser Ile Ser Phe Cys Ala			
210	215	220	
ttt aca caa agg tca ctt ttg gtt gtg tgt tcc aaa tat tgg agg gtg			720
Phe Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Val Cys Ser Lys Tyr Trp Arg Val			
225	230	235	240
ttc gat gcc gga gac tat tcc ttg ttg tgt tca ggt cct agt gaa aat			768

Phe Asp Ala Gly Asp Tyr Ser Leu Leu Cys Ser Gly Pro Ser Glu Asn	
245	250
gga cag aca tgg acc ggg ggg gac ttt gtc tca tca gat aaa gtc atc	816
Gly Gln Thr Trp Thr Gly Gly Asp Phe Val Ser Ser Asp Lys Val Ile	
260	270
att tgg aca gaa aat ggg caa agt tat att tac aaa cta cct gcc agt	864
Ile Trp Thr Glu Asn Gly Gln Ser Tyr Ile Tyr Lys Leu Pro Ala Ser	
275	285
tgc ctt cca gct agt gat tca ttc cgc agt gat gtg ggg aag gca gtt	912
Cys Leu Pro Ala Ser Asp Ser Phe Arg Ser Asp Val Gly Lys Ala Val	
290	300
gaa aat tta att cct cct gta caa cat atc ctc ttg gat cga aaa gat	960
Glu Asn Leu Ile Pro Pro Val Gln His Ile Leu Leu Asp Arg Lys Asp	
305	315
aaa gag ttg cta att tgt cct cct gtt act cgg ttc ttc tat gga tgc	1008
Lys Glu Leu Leu Ile Cys Pro Pro Val Thr Arg Phe Phe Tyr Gly Cys	
325	335
aga gaa tat ttc cat aaa ctg tta att cag ggt gat tct tct gga agg	1056
Arg Glu Tyr Phe His Lys Leu Leu Ile Gln Gly Asp Ser Ser Gly Arg	
340	350
ttg aat att tgg aac ata tca gac aca gct gat aaa cag gga agt gaa	1104
Leu Asn Ile Trp Asn Ile Ser Asp Thr Ala Asp Lys Gln Gly Ser Glu	
355	365
gaa ggg ctg gca atg aca act tct att agt ttg caa gag gca ttt gat	1152
Glu Gly Leu Ala Met Thr Thr Ser Ile Ser Leu Gln Glu Ala Phe Asp	
370	380
aaa ctg aat cct tgt cct gct gga att ata gat cag ctg agt gtg att	1200
Lys Leu Asn Pro Cys Pro Ala Gly Ile Ile Asp Gln Leu Ser Val Ile	
385	400

ccc aat agt aat gaa cct ctt aaa gta act gca agt gtg tac ata cca	1248
Pro Asn Ser Asn Glu Pro Leu Lys Val Thr Ala Ser Val Tyr Ile Pro	
405 410 415	
gca cat gga cga ctt gtt tgt ggt cgt gaa gat gga agc ata gtt att	1296
Ala His Gly Arg Leu Val Cys Gly Arg Glu Asp Gly Ser Ile Val Ile	
420 425 430	
gta cct gcc aca cag acg gcc ata gta cag ctg ttg caa ggg gaa cac	1344
Val Pro Ala Thr Gln Thr Ala Ile Val Gln Leu Leu Gln Gly Glu His	
435 440 445	
atg ctc aga aga ggt tgg cca cct cac aga aca ctc cgt ggt cat cgg	1392
Met Leu Arg Arg Gly Trp Pro Pro His Arg Thr Leu Arg Gly His Arg	
450 455 460	
aac aaa gtc aca tgt ttg cta tat cct cat cag gtc tca gct cgg tat	1440
Asn Lys Val Thr Cys Leu Leu Tyr Pro His Gln Val Ser Ala Arg Tyr	
465 470 475 480	
gat caa aga tac ctg ata tct gga ggt gtg gat ttt tca gtc ata att	1488
Asp Gln Arg Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Val Asp Phe Ser Val Ile Ile	
485 490 495	
tgg gac ata ttt tct gga gaa atg aaa cat atc ttc tgt gtt cat ggt	1536
Trp Asp Ile Phe Ser Gly Glu Met Lys His Ile Phe Cys Val His Gly	
500 505 510	
ggt gag att act caa ctt cta gtt cca cct gaa aac tgt agt gca aga	1584
Gly Glu Ile Thr Gln Leu Leu Val Pro Pro Glu Asn Cys Ser Ala Arg	
515 520 525	
gta cag cac tgc atc tgc tct gta gcc agt gac cac tca gta gga ctt	1632
Val Gln His Cys Ile Cys Ser Val Ala Ser Asp His Ser Val Gly Leu	
530 535 540	
cta agt ttg cga gag aaa aaa tgc ata atg ttg gca tct cgt cac ctt	1680
Leu Ser Leu Arg Glu Lys Lys Cys Ile Met Leu Ala Ser Arg His Leu	

545	550	555	560	
ttt cct att caa gta atc aaa tgg agg cct tct gat gat tac ctg gtg				1728
Phe Pro Ile Gln Val Ile Lys Trp Arg Pro Ser Asp Asp Tyr Leu Val				
	565	570	575	
gtg ggg tgt tca gat ggt tct gtg tac gtc tgg caa atg gat act ggt				1776
Val Gly Cys Ser Asp Gly Ser Val Tyr Val Trp Gln Met Asp Thr Gly				
	580	585	590	
gca ttg gat cgt tgt gtg atg ggg ata aca gca gtt gag att cta aac				1824
Ala Leu Asp Arg Cys Val Met Gly Ile Thr Ala Val Glu Ile Leu Asn				
	595	600	605	
gct tgt gat gaa gct gtt cct gct gct gtt gat tca ctt agt cat cca				1872
Ala Cys Asp Glu Ala Val Pro Ala Ala Val Asp Ser Leu Ser His Pro				
	610	615	620	
gca gtc aac cta aaa caa gct atg acg aga cgt agt ctt gct gct ctt				1920
Ala Val Asn Leu Lys Gln Ala Met Thr Arg Arg Ser Leu Ala Ala Leu				
	625	630	635	640
aaa aat atg gcc cat cat aag cta caa acc ctt gca act aac ctc ttg				1968
Lys Asn Met Ala His His Lys Leu Gln Thr Leu Ala Thr Asn Leu Leu				
	645	650	655	
gct tct gag gca tct gac aag gga aat tta cct aaa tat tct cat aac				2016
Ala Ser Glu Ala Ser Asp Lys Gly Asn Leu Pro Lys Tyr Ser His Asn				
	660	665	670	
tcc ctg atg gtt caa gca ata aag aca aac cta aca gac ccg gac ata				2064
Ser Leu Met Val Gln Ala Ile Lys Thr Asn Leu Thr Asp Pro Asp Ile				
	675	680	685	
cat gtg cta ttc ttt gat gtg gaa gcg ttg att att caa ctc ctg act				2112
His Val Leu Phe Phe Asp Val Glu Ala Leu Ile Ile Gln Leu Leu Thr				
	690	695	700	
gaa gaa gcc tct agg ccg aat act gct ctt att tcc cca gag aat ttg				2160

Glu Glu Ala Ser Arg Pro Asn Thr Ala Leu Ile Ser Pro Glu Asn Leu  
 705                      710                      715                      720  
 caa aaa gca tct ggc agt tca gac aaa ggg ggc tct ttt tta act gga      2208  
 Gln Lys Ala Ser Gly Ser Ser Asp Lys Gly Gly Ser Phe Leu Thr Gly  
                                  725                      730                      735  
 aaa cga gca gca gtt ctc ttc caa caa gtg aaa gaa acg atc aaa gag      2256  
 Lys Arg Ala Ala Val Leu Phe Gln Gln Val Lys Glu Thr Ile Lys Glu  
                                  740                      745                      750  
 aac atc aag gaa cac ctc ctt gat gat gaa gag gag gat gag gag ata      2304  
 Asn Ile Lys Glu His Leu Leu Asp Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Ile  
                                  755                      760                      765  
 atg agg cag aga agg gaa gaa agt gat cct gaa tat cgg tcc agc aaa      2352  
 Met Arg Gln Arg Arg Glu Glu Ser Asp Pro Glu Tyr Arg Ser Ser Lys  
                                  770                      775                      780  
 tca aag cca ttg acc cta tta gaa tat aat tta act atg gac act gca      2400  
 Ser Lys Pro Leu Thr Leu Leu Glu Tyr Asn Leu Thr Met Asp Thr Ala  
 785                      790                      795                      800  
 aag ctg ttt atg tcc tgc ctt cac gcc tgg ggt ttg aat gaa gta ctg      2448  
 Lys Leu Phe Met Ser Cys Leu His Ala Trp Gly Leu Asn Glu Val Leu  
                                  805                      810                      815  
 gat gaa gtt tgc ctg gat cgc ctt gga atg ctg aaa ccc cac tgc acc      2496  
 Asp Glu Val Cys Leu Asp Arg Leu Gly Met Leu Lys Pro His Cys Thr  
                                  820                      825                      830  
 gta tcg ttt ggc ctc ttg tca aga gga ggc cat atg tca ctg atg ctg      2544  
 Val Ser Phe Gly Leu Leu Ser Arg Gly Gly His Met Ser Leu Met Leu  
                                  835                      840                      845  
 ccg ggt tat aat cag cct gct tgt aaa ctg tca cat ggg aaa aca gaa      2592  
 Pro Gly Tyr Asn Gln Pro Ala Cys Lys Leu Ser His Gly Lys Thr Glu  
                                  850                      855                      860

gta gga agg aag ctg cca gcg tct gag gga gta gga aag gga act tac	2640
Val Gly Arg Lys Leu Pro Ala Ser Glu Gly Val Gly Lys Gly Thr Tyr	
865                      870                      875                      880	
gga gtg tcc cgt gcc gtc acc aca cag cat ctc ctg tct atc att tct	2688
Gly Val Ser Arg Ala Val Thr Thr Gln His Leu Leu Ser Ile Ile Ser	
885                      890                      895	
ttg gca aat act tta atg agt atg acc aat gca act ttt att ggt gat	2736
Leu Ala Asn Thr Leu Met Ser Met Thr Asn Ala Thr Phe Ile Gly Asp	
900                      905                      910	
cat atg aag aag ggt cct acc agg cca cct aga cca agc acc cca gac	2784
His Met Lys Lys Gly Pro Thr Arg Pro Pro Arg Pro Ser Thr Pro Asp	
915                      920                      925	
ctt tct aag gca agg ggt tcc cct cca act tcc agt aat att gtg caa	2832
Leu Ser Lys Ala Arg Gly Ser Pro Pro Thr Ser Ser Asn Ile Val Gln	
930                      935                      940	
gga cag att aaa caa gtt gct gca cct gtc gtt tcc gct cgg tct gat	2880
Gly Gln Ile Lys Gln Val Ala Ala Pro Val Val Ser Ala Arg Ser Asp	
945                      950                      955                      960	
gct gat cac tct ggc tct gac cct cct tct gct cct gct tta cat acc	2928
Ala Asp His Ser Gly Ser Asp Pro Pro Ser Ala Pro Ala Leu His Thr	
965                      970                      975	
tgt ttc tta gta aat gaa ggt tgg agt cag tta gct gct atg cac tgt	2976
Cys Phe Leu Val Asn Glu Gly Trp Ser Gln Leu Ala Ala Met His Cys	
980                      985                      990	
gtt atg ctg cca gac cta ctg gga ttg gat aaa ttt agg cct ccc ctt	3024
Val Met Leu Pro Asp Leu Leu Gly Leu Asp Lys Phe Arg Pro Pro Leu	
995                      1000                      1005	
ctg gag atg ctg gcc cga aga tgg caa gat cga tgc ttg gag gtg	3069
Leu Glu Met Leu Ala Arg Arg Trp Gln Asp Arg Cys Leu Glu Val	

1010	1015	1020	
aga gaa gcc gca cag gcc ctg	ctt ctg gcg gaa ctg	aga aga att	3114
Arg Glu Ala Ala Gln Ala Leu	Leu Leu Ala Glu Leu	Arg Arg Ile	
1025	1030	1035	
gag cag gca ggc agg aag gaa	gcc att gat gcc tgg	gct cct tac	3159
Glu Gln Ala Gly Arg Lys Glu	Ala Ile Asp Ala Trp	Ala Pro Tyr	
1040	1045	1050	
tta cct cag tac ata gac cac	gtc ata tca cct gga	gtc aca tca	3204
Leu Pro Gln Tyr Ile Asp His	Val Ile Ser Pro Gly	Val Thr Ser	
1055	1060	1065	
gaa gcc gcg cag act atc acc	acg gct cct gat gcc	tca ggg cct	3249
Glu Ala Ala Gln Thr Ile Thr	Thr Ala Pro Asp Ala	Ser Gly Pro	
1070	1075	1080	
gaa gca aaa gtc cag gag gaa	gag cat gac ctt gtt	gac gat gac	3294
Glu Ala Lys Val Gln Glu Glu	Glu His Asp Leu Val	Asp Asp Asp	
1085	1090	1095	
atc acc act ggt tgc tta tca	agt gtc cca caa atg	aaa aaa att	3339
Ile Thr Thr Gly Cys Leu Ser	Ser Val Pro Gln Met	Lys Lys Ile	
1100	1105	1110	
tct aca tct tac gag gaa aga	cgg aag caa gct acc	gct att gtt	3384
Ser Thr Ser Tyr Glu Glu Arg	Arg Lys Gln Ala Thr	Ala Ile Val	
1115	1120	1125	
tta ctt gga gta ata gga gct	gaa ttt ggt gct gaa	att gaa cct	3429
Leu Leu Gly Val Ile Gly Ala	Glu Phe Gly Ala Glu	Ile Glu Pro	
1130	1135	1140	
cct aaa cta ttg acc aga cct	cga agc tct agc caa	att cct gag	3474
Pro Lys Leu Leu Thr Arg Pro	Arg Ser Ser Ser Gln	Ile Pro Glu	
1145	1150	1155	
gga ttc ggg ttg act agt ggt	gga tcc aac tac tcg	ctg gcc aga	3519

Gly Phe	Gly Leu Thr Ser Gly	Gly Ser Asn Tyr Ser	Leu Ala Arg	
1160	1165	1170		
cat act	tgc aag gca ctg acg	ttt ctt ctg cta cag	cct cca agc	3564
His Thr	Cys Lys Ala Leu Thr	Phe Leu Leu Leu Gln	Pro Pro Ser	
1175	1180	1185		
ccc aaa	ctt cct cca cac agc	act atc cga aga aca	gcc att gat	3609
Pro Lys	Leu Pro Pro His Ser	Thr Ile Arg Arg Thr	Ala Ile Asp	
1190	1195	1200		
ctg att	gga cgt ggg ttc act	gtt tgg gag cct tac	atg gat gtg	3654
Leu Ile	Gly Arg Gly Phe Thr	Val Trp Glu Pro Tyr	Met Asp Val	
1205	1210	1215		
tcc gct	gtt ctg atg ggg ctt	ctc gaa ctt tgt gcc	gat gcc gag	3699
Ser Ala	Val Leu Met Gly Leu	Leu Glu Leu Cys Ala	Asp Ala Glu	
1220	1225	1230		
aaa caa	ctt gcc aac atc aca	atg ggg ttg cct ctg	agc cca gca	3744
Lys Gln	Leu Ala Asn Ile Thr	Met Gly Leu Pro Leu	Ser Pro Ala	
1235	1240	1245		
gct gac	tcg gcc cgc tct gcg	agg cat gcc ctc tcg	ctc att gcc	3789
Ala Asp	Ser Ala Arg Ser Ala	Arg His Ala Leu Ser	Leu Ile Ala	
1250	1255	1260		
acc gcc	aga cca ccc gcc ttc	atc acc acc ata gcc	aaa gag gta	3834
Thr Ala	Arg Pro Pro Ala Phe	Ile Thr Thr Ile Ala	Lys Glu Val	
1265	1270	1275		
cac aga	cat acg gct ctt gca	gca aat acc caa tca	cag cag aat	3879
His Arg	His Thr Ala Leu Ala	Ala Asn Thr Gln Ser	Gln Gln Asn	
1280	1285	1290		
atg cac	aca aca act ctt gca	cga gct aaa ggg gaa	att ttg aga	3924
Met His	Thr Thr Thr Leu Ala	Arg Ala Lys Gly Glu	Ile Leu Arg	
1295	1300	1305		

gtc att gaa att ctt att gaa aag atg ccc aca gat gtt gtg gat	3969
Val Ile Glu Ile Leu Ile Glu Lys Met Pro Thr Asp Val Val Asp	
1310 1315 1320	
ctt ctc gtg gag gtt atg gac atc att atg tac tgc ctt gaa gga	4014
Leu Leu Val Glu Val Met Asp Ile Ile Met Tyr Cys Leu Glu Gly	
1325 1330 1335	
tct tta gtt aaa aag aaa ggt ctt caa gaa tgt ttc cca gcc atc	4059
Ser Leu Val Lys Lys Lys Gly Leu Gln Glu Cys Phe Pro Ala Ile	
1340 1345 1350	
tgc agg ttc tac atg gtc agc tat tat gag cgg aat cac aga ata	4104
Cys Arg Phe Tyr Met Val Ser Tyr Tyr Glu Arg Asn His Arg Ile	
1355 1360 1365	
gca gtt gga gct cgc cat ggt tca gtg gcc ctg tac gac atc cgg	4149
Ala Val Gly Ala Arg His Gly Ser Val Ala Leu Tyr Asp Ile Arg	
1370 1375 1380	
act gga aaa tgt cag aca atc cat gga cac aag gga cca atc act	4194
Thr Gly Lys Cys Gln Thr Ile His Gly His Lys Gly Pro Ile Thr	
1385 1390 1395	
gca gtg gct ttt gct cct gat gga aga tat ctt gcc acc tac tca	4239
Ala Val Ala Phe Ala Pro Asp Gly Arg Tyr Leu Ala Thr Tyr Ser	
1400 1405 1410	
aac act gac agc cac att tct ttt tgg cag atg aac acg tca ctg	4284
Asn Thr Asp Ser His Ile Ser Phe Trp Gln Met Asn Thr Ser Leu	
1415 1420 1425	
ctg gga agc atc ggc atg ctg aac tcg gca cct cag ctg cgc tgc	4329
Leu Gly Ser Ile Gly Met Leu Asn Ser Ala Pro Gln Leu Arg Cys	
1430 1435 1440	
att aaa acc tac cag gtg ccc cct gtg cag ccc gcg tcc ccc ggc	4374
Ile Lys Thr Tyr Gln Val Pro Pro Val Gln Pro Ala Ser Pro Gly	

<210>	2
<211>	1490
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

```

<400> 2
Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Leu Pro Ile Val Leu Trp Gly Arg Lys
1          5          10          15
Ala Pro Thr His Cys Ile Ser Ala Val Leu Leu Thr Asp Asp Gly Ala
          20          25          30
Thr Ile Val Thr Gly Cys His Asp Gly Gln Ile Cys Leu Trp Asp Leu
          35          40          45
Ser Val Glu Leu Gln Ile Asn Pro Arg Ala Leu Leu Phe Gly His Thr
          50          55          60
Ala Ser Ile Thr Cys Leu Ser Lys Ala Cys Ala Ser Ser Asp Lys Gln
65          70          75          80
Tyr Ile Val Ser Ala Ser Glu Ser Gly Glu Met Cys Leu Trp Asp Val
          85          90          95

```

Ser Asp Gly Arg Cys Ile Glu Phe Thr Lys Leu Ala Cys Thr His Thr  
 100 105 110  
 Gly Ile Gln Phe Tyr Gln Phe Ser Val Gly Asn Gln Arg Glu Gly Arg  
 115 120 125  
 Leu Leu Cys His Gly His Tyr Pro Glu Ile Leu Val Val Asp Ala Thr  
 130 135 140  
 Ser Leu Glu Val Leu Tyr Ser Leu Val Ser Lys Ile Ser Pro Asp Trp  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Ser Met Ser Ile Ile Arg Ser His Arg Thr Gln Glu Asp Thr  
 165 170 175  
 Val Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Ile Leu Lys Val Trp Ile Val Thr  
 180 185 190  
 Ser Glu Ile Ser Asp Met Gln Asp Thr Glu Pro Ile Phe Glu Glu Glu  
 195 200 205  
 Ser Lys Pro Ile Tyr Cys Gln Asn Cys Gln Ser Ile Ser Phe Cys Ala  
 210 215 220  
 Phe Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Val Cys Ser Lys Tyr Trp Arg Val  
 225 230 235 240  
 Phe Asp Ala Gly Asp Tyr Ser Leu Leu Cys Ser Gly Pro Ser Glu Asn  
 245 250 255  
 Gly Gln Thr Trp Thr Gly Gly Asp Phe Val Ser Ser Asp Lys Val Ile  
 260 265 270  
 Ile Trp Thr Glu Asn Gly Gln Ser Tyr Ile Tyr Lys Leu Pro Ala Ser  
 275 280 285  
 Cys Leu Pro Ala Ser Asp Ser Phe Arg Ser Asp Val Gly Lys Ala Val  
 290 295 300  
 Glu Asn Leu Ile Pro Pro Val Gln His Ile Leu Leu Asp Arg Lys Asp  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Leu Leu Ile Cys Pro Pro Val Thr Arg Phe Phe Tyr Gly Cys

出証特 2003-3058864

Phe Pro Ile Gln Val Ile Lys Trp Arg Pro Ser Asp Asp Tyr Leu Val  
 565 570 575  
 Val Gly Cys Ser Asp Gly Ser Val Tyr Val Trp Gln Met Asp Thr Gly  
 580 585 590  
 Ala Leu Asp Arg Cys Val Met Gly Ile Thr Ala Val Glu Ile Leu Asn  
 595 600 605  
 Ala Cys Asp Glu Ala Val Pro Ala Ala Val Asp Ser Leu Ser His Pro  
 610 615 620  
 Ala Val Asn Leu Lys Gln Ala Met Thr Arg Arg Ser Leu Ala Ala Leu  
 625 630 635 640  
 Lys Asn Met Ala His His Lys Leu Gln Thr Leu Ala Thr Asn Leu Leu  
 645 650 655  
 Ala Ser Glu Ala Ser Asp Lys Gly Asn Leu Pro Lys Tyr Ser His Asn  
 660 665 670  
 Ser Leu Met Val Gln Ala Ile Lys Thr Asn Leu Thr Asp Pro Asp Ile  
 675 680 685  
 His Val Leu Phe Phe Asp Val Glu Ala Leu Ile Ile Gln Leu Leu Thr  
 690 695 700  
 Glu Glu Ala Ser Arg Pro Asn Thr Ala Leu Ile Ser Pro Glu Asn Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Lys Ala Ser Gly Ser Ser Asp Lys Gly Gly Ser Phe Leu Thr Gly  
 725 730 735  
 Lys Arg Ala Ala Val Leu Phe Gln Gln Val Lys Glu Thr Ile Lys Glu  
 740 745 750  
 Asn Ile Lys Glu His Leu Leu Asp Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Ile  
 755 760 765  
 Met Arg Gln Arg Arg Glu Glu Ser Asp Pro Glu Tyr Arg Ser Ser Lys  
 770 775 780  
 Ser Lys Pro Leu Thr Leu Leu Glu Tyr Asn Leu Thr Met Asp Thr Ala

出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 8 8 6 4

Glu Ala Ala Gln Ala Leu Leu Leu Ala Glu Leu Arg Arg Ile Glu Gln  
1025 1030 1035 1040  
Ala Gly Arg Lys Glu Ala Ile Asp Ala Trp Ala Pro Tyr Leu Pro Gln  
1045 1050 1055  
Tyr Ile Asp His Val Ile Ser Pro Gly Val Thr Ser Glu Ala Ala Gln  
1060 1065 1070  
Thr Ile Thr Thr Ala Pro Asp Ala Ser Gly Pro Glu Ala Lys Val Gln  
1075 1080 1085  
Glu Glu Glu His Asp Leu Val Asp Asp Asp Ile Thr Thr Gly Cys Leu  
1090 1095 1100  
Ser Ser Val Pro Gln Met Lys Lys Ile Ser Thr Ser Tyr Glu Glu Arg  
1105 1110 1115 1120  
Arg Lys Gln Ala Thr Ala Ile Val Leu Leu Gly Val Ile Gly Ala Glu  
1125 1130 1135  
Phe Gly Ala Glu Ile Glu Pro Pro Lys Leu Leu Thr Arg Pro Arg Ser  
1140 1145 1150  
Ser Ser Gln Ile Pro Glu Gly Phe Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Asn  
1155 1160 1165  
Tyr Ser Leu Ala Arg His Thr Cys Lys Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu  
1170 1175 1180  
Gln Pro Pro Ser Pro Lys Leu Pro Pro His Ser Thr Ile Arg Arg Thr  
1185 1190 1195 1200  
Ala Ile Asp Leu Ile Gly Arg Gly Phe Thr Val Trp Glu Pro Tyr Met  
1205 1210 1215  
Asp Val Ser Ala Val Leu Met Gly Leu Leu Glu Leu Cys Ala Asp Ala  
1220 1225 1230  
Glu Lys Gln Leu Ala Asn Ile Thr Met Gly Leu Pro Leu Ser Pro Ala  
1235 1240 1245  
Ala Asp Ser Ala Arg Ser Ala Arg His Ala Leu Ser Leu Ile Ala Thr

1250	1255	1260	
Ala Arg Pro Pro Ala Phe Ile Thr Thr Ile Ala Lys Glu Val His Arg			
1265	1270	1275	1280
His Thr Ala Leu Ala Ala Asn Thr Gln Ser Gln Gln Asn Met His Thr			
1285	1290	1295	
Thr Thr Leu Ala Arg Ala Lys Gly Glu Ile Leu Arg Val Ile Glu Ile			
1300	1305	1310	
Leu Ile Glu Lys Met Pro Thr Asp Val Val Asp Leu Leu Val Glu Val			
1315	1320	1325	
Met Asp Ile Ile Met Tyr Cys Leu Glu Gly Ser Leu Val Lys Lys Lys			
1330	1335	1340	
Gly Leu Gln Glu Cys Phe Pro Ala Ile Cys Arg Phe Tyr Met Val Ser			
1345	1350	1355	1360
Tyr Tyr Glu Arg Asn His Arg Ile Ala Val Gly Ala Arg His Gly Ser			
1365	1370	1375	
Val Ala Leu Tyr Asp Ile Arg Thr Gly Lys Cys Gln Thr Ile His Gly			
1380	1385	1390	
His Lys Gly Pro Ile Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Asp Gly Arg Tyr			
1395	1400	1405	
Leu Ala Thr Tyr Ser Asn Thr Asp Ser His Ile Ser Phe Trp Gln Met			
1410	1415	1420	
Asn Thr Ser Leu Leu Gly Ser Ile Gly Met Leu Asn Ser Ala Pro Gln			
1425	1430	1435	1440
Leu Arg Cys Ile Lys Thr Tyr Gln Val Pro Pro Val Gln Pro Ala Ser			
1445	1450	1455	
Pro Gly Ser His Asn Ala Leu Lys Leu Ala Arg Leu Ile Trp Thr Ser			
1460	1465	1470	
Asn Arg Asn Val Ile Leu Met Ala His Asp Gly Lys Glu His Arg Phe			
1475	1480	1485	

Met Val

1490

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

atggcaggaa acagccttgt tctaccatt gtgc 34

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gtgtcattg ccagcccttc ttcacttccc 30

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 p160（ラブコネクチン 3  $\beta$ ）の単離と一次構造の概要。(A) 抗Rab 3 GEP抗体によるp160（ラブコネクチン 3  $\beta$ ）の共免疫沈降の結果（電気泳動写真）。1; p340、2; p200、3; p160、4; p60。(B)構造概要。グレーはWDドメイン

を示す。(C)リコンビナントラブコネクチン3 $\beta$ のウェスタンブロッティングの結果(電気泳動写真)。レーン1, 対照群HEK293細胞(1 $\mu$ g蛋白質)、レーン2, pCMVFa ラブコネクチン3 $\beta$ をトランスフェクトしたHEK293細胞(1 $\mu$ g蛋白質)、レーン3, ラット脳ホモジェネート(20 $\mu$ g蛋白質)。

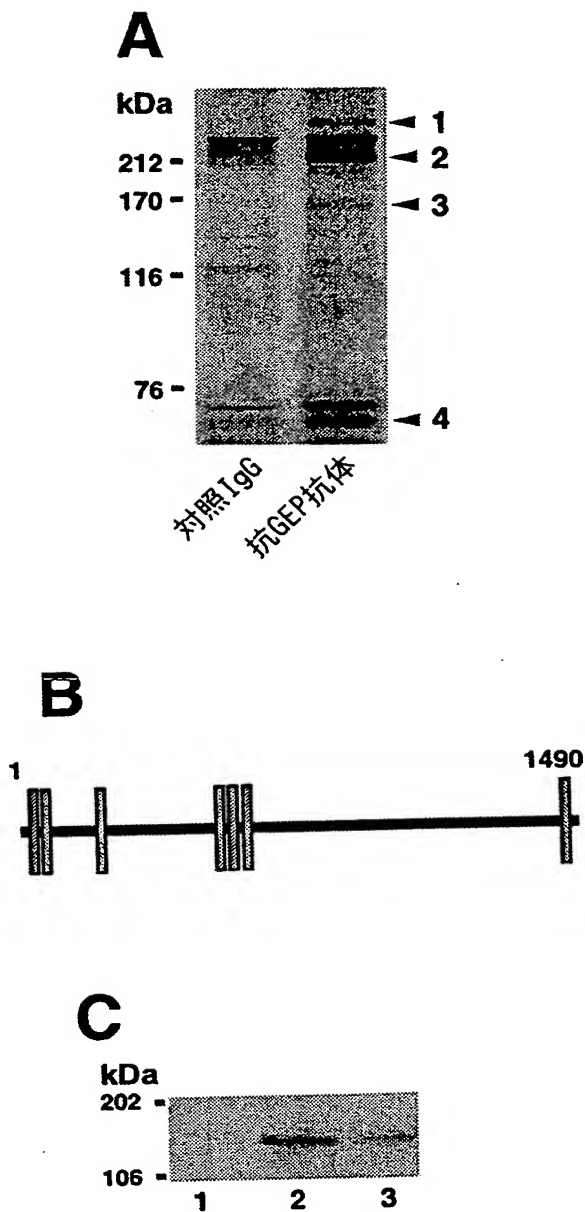
【図2】 ラブコネクチン3 $\beta$ の組織および細胞レベル下の分布。(A)組織分布(電気泳動写真)。(B)細胞レベル下分布(電気泳動写真)。Rc-3 $\beta$ , ラブコネクチン3 $\beta$ 、Rc-3 $\alpha$ , ラブコネクチン3 $\alpha$ 、GEP, Rab3 GEP、Ho, ホモジェネート画分、P1, 核ペレット画分、P2, 粗シナプトソーム画分、P3, ミクロソーム画分、S, 可溶性細胞質画分、P2A, ミエリン画分、P2B, 小胞体およびゴルジ複合体画分、P2C, シナプトソーム画分、P2D, ミトコンドリア画分、SS, シナプス可溶性画分、CSV, 粗シナプス小胞画分、CSM, 粗シナプス膜画分。

【図3】 シナプスにおけるラブコネクチン3 $\alpha$ と3 $\beta$ の共存を示す免疫蛍光顕微鏡像(顕微鏡写真)。

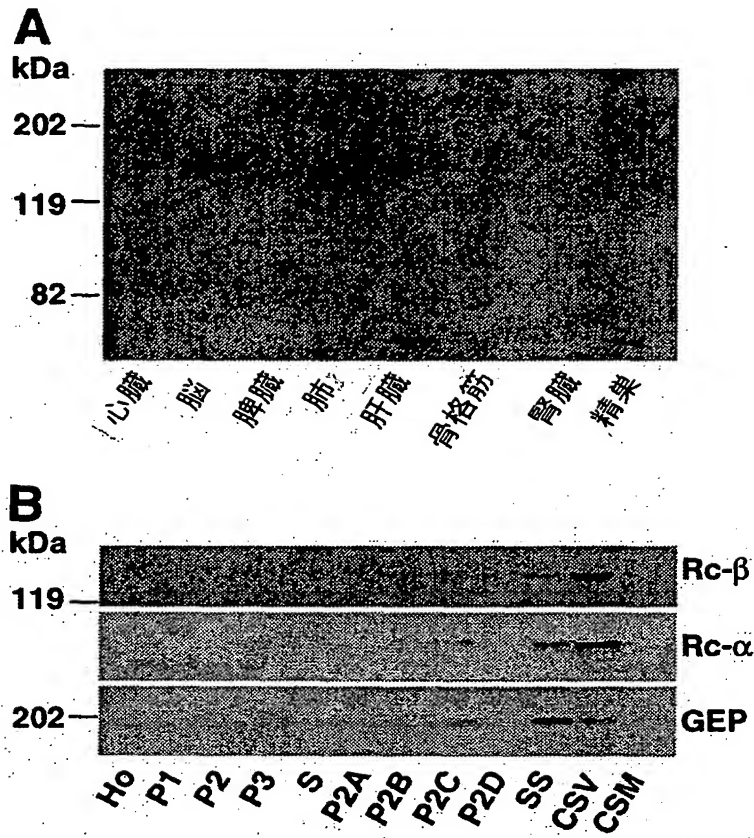
【図4】 ラブコネクチン3に対する、Rab3 GEPの直接的な結合とRab3 GAPの間接的な結合を示すウェスタンブロッティングの結果(電気泳動写真)。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【図 3】

**Aa**

ラブコネクチン 3  $\alpha$

ラブコネクチン 3  $\beta$

併合

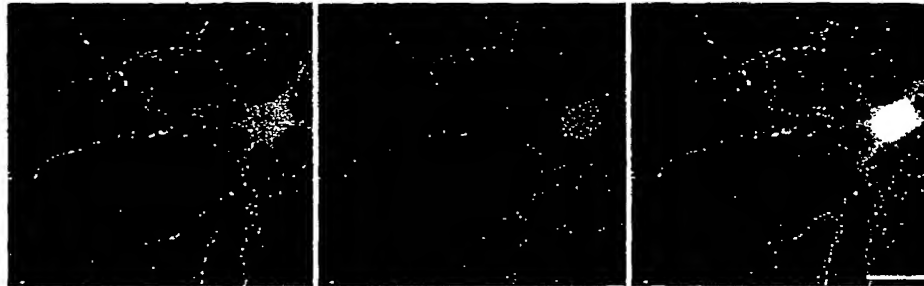


**Ab**

ラブコネクチン 3  $\alpha$

ラブコネクチン 3  $\beta$

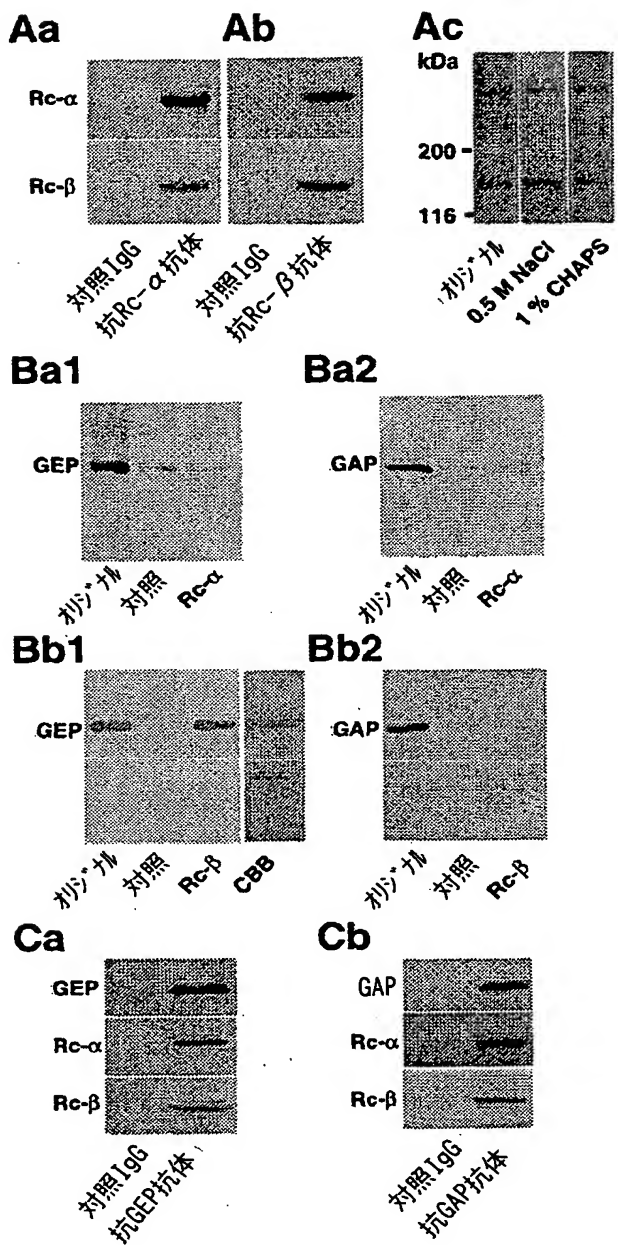
併合



**B**



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質、ならびに、この蛋白質を用いる、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】

抗Rab3 GEP抗体を用いる共免疫沈降により、Rab3Aの活性化および不活性化の制御に関与する蛋白質を特定した。この蛋白質は、ラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合するので、この結合を増加または減少させる物質のスクリーニングに使用できる。

【選択図】 図1



特願 2 0 0 2 - 3 1 9 5 2 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社